

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/032955 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/55, 38/46, A61P 25/00, 25/28, 43/00, C12N 5/06 // C07K 14/81, C12N 9/16

(74) 代理人: 朝日奈 宗太, 外(ASAHIINA, Sohta et al.); 〒540-0012 大阪府 大阪市中央区 谷町二丁目 2 番 2 号 NSビル Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012816

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 7 日 (07.10.2003)

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(30) 優先権データ:
特願2002-294815 2002 年 10 月 8 日 (08.10.2002) JP

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 松井 秀樹 (MATSUI, Hideki) [JP/JP]; 〒701-0211 岡山県 岡山市 東畦 1 3 9-1 1-5 0 1 Okayama (JP). 富澤 一仁 (TOMIZAWA, Kazuhito) [JP/JP]; 〒700-0921 岡山県 岡山市 東古松一丁目 1 4-7-6 0 4 Okayama (JP).



WO 2004/032955 A1

(54) Title: INHIBITORS FOR CONTINUOUS ACTIVATION OF CALCINEURIN

(54) 発明の名称: カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide nerve cell death inhibitors efficacious against various diseases which inhibit the continuous activation of calcineurin while showing little side effects. Namely, inhibitors for the continuous activation of calcineurin, more specifically, drugs inhibiting the cleavage of calcineurin A subunit (CaNA) by calpain. Examples thereof include peptides having the amino acid sequences FDGATAAARKEVIRNK (SEQ ID NO:1) and REESESVLTLKGLTPTG (SEQ ID NO:2).

(57) 要約: 本発明は、恒常的なカルシニューリンの活性化を阻害し、副作用が少なく、様々な疾患に有効な神経細胞死抑制を提供することを目的とする。カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤、詳しくは、カルパインによるカルシニューリン A サブユニット (CaNA) の切断を阻害する薬剤。たとえば、FDGATAAARKEVIRNK (配列番号 1) および REESESVLTLKGLTPTG (配列番号 2) のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/032955 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/55, 38/46, A61P 25/00, 25/28, 43/00, C12N 5/06 // C07K 14/81, C12N 9/16

(74) 代理人: 朝日奈 宗太, 外 (ASAHIINA, Sohta et al.); 〒540-0012 大阪府 大阪市中央区 谷町二丁目 2 番 2 号 NS ビル Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012816

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 7 日 (07.10.2003)

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(30) 優先権データ:
特願2002-294815 2002 年 10 月 8 日 (08.10.2002) JP

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 松井 秀樹 (MATSUI, Hideki) [JP/JP]; 〒701-0211 岡山県 岡山市 東畦 1 3 9-1 1-5 0 1 Okayama (JP). 富澤 一仁 (TOMIZAWA, Kazuhito) [JP/JP]; 〒700-0921 岡山県 岡山市 東古松一丁目 1 4-7-6 0 4 Okayama (JP).

(54) Title: INHIBITORS FOR CONTINUOUS ACTIVATION OF CALCINEURIN

(54) 発明の名称: カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide nerve cell death inhibitors efficacious against various diseases which inhibit the continuous activation of calcineurin while showing little side effects. Namely, inhibitors for the continuous activation of calcineurin, more specifically, drugs inhibiting the cleavage of calcineurin A subunit (CaNA) by calpain. Examples thereof include peptides having the amino acid sequences FDGATAAARKEVIRNK (SEQ ID NO:1) and REESESVLTLKGLTPTG (SEQ ID NO:2).

(57) 要約: 本発明は、恒常的なカルシニューリンの活性化を阻害し、副作用が少なく、様々な疾患に有効な神経細胞死抑制を提供することを目的とする。カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤、詳しくは、カルパインによるカルシニューリン A サブユニット (CaNA) の切断を阻害する薬剤。たとえば、FDGATAAARKEVIRNK (配列番号 1) および REESESVLTLKGLTPTG (配列番号 2) のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。

明 細 書

カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤

技術分野

本発明は、カルシニューリンの恒常的活性化阻害剤に関する。詳しくは、本発明は、カルパインによるカルシニューリンAサブユニット（CaNA）の切断を阻害する薬剤に関する。

背景技術

カルシニューリンは、カルシウムおよびカルモジュリン依存的に活性化される脱リン酸化酵素であり、活性中心を有するカルシニューリンAサブユニット（CaNA）および調節因子であるカルシニューリンBサブユニット（CaNB）からなる複合体である。カルシニューリンは、活性中心と基質との会合を自己阻害ドメインにより阻害しているため、通常細胞内において非活性型である。細胞内のカルシウム濃度が上昇すると、カルシニューリンの構造が変化して自己阻害ドメインが開き（活性型）、基質が活性中心に会合できるようになる。また、カルシウム濃度が減少すると、カルシニューリンは再び非活性型に戻る。このように、カルシニューリンについては従来、カルシウム濃度により可逆的に活性化されることが知られている。

1999年、カルシニューリンが神経細胞死に重要な役割を担っていることが報告された（アサイ アキオ等、ジェー・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biological Chemistry）、第274巻、p. 34450、1999年参照）。さらに、カルシニューリンの特異的阻害剤（免疫抑制剤FK506およびサイクロスポリンA）が神経細胞死を抑制することも報

告されている（モリオカ モトヒロ等、プロGRESS・イン・ニューロバイオロジー（Progress in Neurobiology）、第58巻、p. 1、1999年およびスプリンガー ジョー イー（Springer Joe E）等、ザ・ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス（The Journal of Neuroscience）、第20巻、p. 7246、2000年参照）。これらの文献を含む多くの報告に基づき、脳虚血および脊椎損傷などで認められる神経細胞死に関しては、神経細胞の興奮によってグルタミン酸受容体の1つであるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体（NMDA受容体）が異常に活性化し、該受容体から細胞内への多量のカルシウムの流入によりカルシニューリンが活性化されて細胞死を誘発するというメカニズムが現在提唱されている。しかしながら、該カルシウムの流入は一過性であり、カルシニューリンの活性化状態は長期間持続しない。したがって、一過性の細胞内カルシウム濃度上昇ではなく、長期にカルシニューリンが活性化されるほかのメカニズムの存在が想像されていたが、そのようなメカニズムに関する報告はなされていない。

前述したように、神経細胞死の抑制、具体的には虚血性および興奮性神経細胞死の抑制に対しては、免疫抑制剤FK506およびサイクロスポリンAが効果を有することが知られている。しかしながら、それらの薬剤はカルシニューリンが関与するすべての情報伝達を抑制するために副作用が大きいことが知られている（たとえば腎毒性および糖尿病など）。したがって、長期間のカルシニューリン活性化を阻害し、かつ、従来のものと比較してより副作用の少ない神経細胞死の抑制剤が強く望まれている。

発明の開示

本発明は、かかる従来の問題点を解決し、副作用が少なく、様々な疾患に有効な神経細胞死抑制を提供することを目的とする。

前記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、以下の知見を得た。

- 1) グルタミン酸投与により神経細胞死を誘導すると、カルシニューリン A サブユニット (CaNA) の断片化が認められた。
- 2) CaNA の切断部位は、アミノ酸配列における 392 番目 (アルギニン) と 393 番目 (リジン) との間および 421 番目と 425 番目との間であった。
- 3) カルシニューリンが同部位で切断されると、カルシウムおよびカルモジュリン非依存的に活性を有することが明らかになった。
- 4) 前記断片化は、カルシニューリンとは異なる情報伝達経路に属すると考えられていたカルパインにより引き起こされ、カルパイン阻害剤で阻害された。
- 5) CaNA の 392 ~ 393 アミノ酸残基を含むペプチドまたは同 421 ~ 425 アミノ酸残基を含むペプチドを神経細胞内に導入すると、グルタミン酸投与による神経細胞死が抑制された。

前記知見に基づき、一過性の細胞内カルシウム濃度上昇によるカルシニューリン活性化ではなく、長期的なカルシニューリン活性化のメカニズムを標的とした細胞死の抑制剤を開発し、本発明を完成した。すなわち本発明は、

- (1) 配列番号 1 のペプチド、配列番号 2 のペプチドおよび／またはそれらの類似体を含む、カルパインによる CaNA の切断阻害剤、
- (2) 前記 (1) 記載の CaNA の切断阻害剤を有効成分とする神経細胞死抑制剤、
- (3) 前記 (1) 記載の CaNA の切断阻害剤を有効成分とする痴呆性疾患の進行抑制剤、および
- (4) 前記 (1) 記載の CaNA の切断阻害剤を含む細胞および脳スライス培養培地の添加剤

に関する。

図面の簡単な説明

図1は、グルタミン酸添加による神経細胞死誘導時のCaNAの切断、および本発明のCaNAの阻害剤によるCaNA切断の抑制効果を示す写真である。図1(a)はグルタミン酸添加ののち3時間インキュベーションした試料の結果、図1(b)はグルタミン酸添加ののち24時間インキュベーションした試料の結果を示す。図1(a)および(b)において、レーン1はコントロール、レーン2はグルタミン酸のみを添加した試料、レーン3は切断阻害ペプチドのみを添加した試料、ならびにレーン4はグルタミン酸および切断阻害ペプチドを添加した試料を示す。

図2は、グルタミン酸添加により神経細胞死を誘導された神経細胞の数を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のカルパインによるカルシニューリンAサブユニット(CaNA: 配列番号3)の切断阻害剤は、配列番号1のペプチド、配列番号2のペプチドおよび/またはそれらの類似体を含有する化合物であって、カルパインによるCaNAの392～393アミノ酸残基間または同421～425アミノ酸残基間の切断を阻害し、カルシニューリンの恒常的活性化を阻害する物質を意味する。

前記配列番号1のペプチドの類似体としては、配列番号1のペプチドのアミノ酸配列において、たとえばその一部が欠失、置換及び/又は他のアミノ酸配列を挿入もしくはペプチドの末端に付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルパインによるCaNAの切断を阻害するペプチドが包含される。たとえば、配列番号1のペプチド配列における9番目のアミノ酸残

基A r gがL y sへ置換されたペプチドおよび／または10番目のアミノ酸残基L y sがA r gへ置換されたペプチドは、本発明の配列番号1のペプチドの類似体に含まれる。

前記配列番号2のペプチドの類似体としては、配列番号2のペプチドのアミノ酸配列において、たとえばその一部が欠失、置換及び／又は他のアミノ酸配列を挿入もしくはペプチドの末端に付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルパインによるC a N Aの切断を阻害するペプチドが包含される。たとえば、配列番号2のペプチド配列における11番目のアミノ酸残基L y sがA r gへ置換されたペプチドは、本発明の配列番号2のペプチドの類似体に含まれる。

配列番号1または配列番号2のペプチドの類似体（類似体ペプチド）によるC a N A切断阻害活性は、以下のようにして評価することができる。すなわち、試験溶液（0.1 μ Mまたは10 μ Mの類似体ペプチド、5 μ M 精製カルパイン、20 mM T r i s - H C l（pH 7.4）および1 mM C a C l₂）を調製したのち精製カルシニューリン（最終濃度1 μ M）を添加し、30℃で1時間インキュベーションする。ついで、10% SDS-PAGEにより反応液をゲル上で電気泳動し、クマシーブルーにてゲルを染色する。染色の結果、45 kDaおよび48 kDaの分子量としてみられるカルパイン依存性断片化カルシニューリンを定量することにより、評価することができる。

前記ペプチドは、B o c法またはF m o c法による固相または液相合成など、公知の方法を用いて製造することができる。また、そのようにして製造したペプチドを、エーテル沈殿・濾過法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、パフュージョンクロマトグラフィーなどの公知の方法を用いて精製することもできる。

本発明のカルパインによるC a N Aの切断阻害剤は、配列番号1のペプ

チド、配列番号 2 のペプチドおよび／またはそれらの類似体を含有するものであれば、さらなる化合物を含有してもよい。さらなる化合物としては、たとえば、ポリアルギニンペプチド（たとえば、5 個のアルギニンからなるポリアルギニンペプチド）や HIV ウイルスの TAT タンパク質に含有される 11 個のアミノ酸残基からなるタンパク質導入ドメイン（PTD；配列番号 4））などのように 50 % 以上のアルギニンまたはリジンを含有する 7 ～ 30 個で構成される細胞内導入シグナルペプチド、または陽イオン性の水溶性ポリマーである直鎖状ポリエチレンイミン（PEI）などが挙げられる。これらの化合物は、（i）配列番号 1 または 2 のペプチドおよび／またはそれらの類似体に連続して通常のペプチド合成により合成する方法、または（ii）いずれか片方のペプチドに 2 価性架橋剤を、もう一方のペプチドの末端にはシステイン残基を連結させて、両ペプチドを反応させることにより結合する方法などを用い、配列番号 1 または 2 のペプチドおよび／またはそれらの類似体に結合（または融合）することができる。また、そのようにして得られた CaNA の切断阻害剤は、前述の精製方法を用いて精製することができる。

本発明の神経細胞死抑制剤は、前記カルパインによる CaNA の切断阻害剤を有効成分として含有し、神経細胞における長期間の神経細胞死誘導を抑制する薬剤を意味する。神経細胞死抑制剤は、神経細胞死に関連する疾患の予防ないし治療剤としても使用し得る。本発明の神経細胞死抑制剤は、配列番号 2 のペプチドおよび細胞内導入シグナルペプチドからなる CaNA の切断阻害剤を含有することが好ましく、配列番号 1 のペプチド、配列番号 2 のペプチドおよび細胞内導入シグナルペプチドからなる CaNA の切断阻害剤を含有することがさらに好ましい。前記神経細胞死に関連する疾患の予防ないし治療剤は、神経細胞死に関連する疾患の予防ないし治療のために有効量の神経細胞死抑制剤を含有する医薬を意味する。神経

細胞死に関連する疾患としては、たとえばアルツハイマー病、痴呆性疾患、脳虚血性疾患、くも膜下出血などの脳内出血、脊髄損傷、パーキンソン病およびてんかんなどが挙げられる。

本発明の神経細胞死抑制剤の投与経路としては、たとえば経口投与、経静脈的投与および脳内直接投与などが挙げられ、患者への負担、副作用の点から、経口投与がより望ましい。

本発明の神経細胞死抑制剤の剤形は、投与方法によって適宜設定することができる。具体的には、水溶液、乳剤、懸濁液などの液剤、錠剤およびカプセル剤などが挙げられる。たとえば、経口投与の場合は錠剤またはカプセル剤が好ましく、経静脈的投与あるいは脳内直接投与の場合は液剤が好ましい。本発明の神経細胞死抑制剤の製剤化には、その剤形に合わせて通常当業者により使用される様々な添加物を使用することができる。例えば、酸化防止剤、pH調整剤、防腐剤などが挙げられる。

前記神経細胞死抑制剤の投与量は、投与方法、適用する患者の年齢、体重および病状などによって適宜設定することができる。たとえば、本発明のカルパインによるCaNAの切断阻害剤に換算して一日に0.1mg/kg以上が好ましく、1mg/kg以上がより好ましい。投与量が0.1mg/kgより少ない場合にはCaNA切断阻害効果が半減する傾向がある。また、投与量は、本発明のカルパインによるCaNAの切断阻害剤に換算して一日に100mg/kg以下が好ましく、20mg/kg以下がより好ましい。投与量が100mg/kgを超える場合、細胞毒性を示す傾向がある。本発明の神経細胞死抑制剤の投与は、単回または複数回のどちらで行っても良い。

本発明の細胞培養培地または脳スライス培養培地の添加剤は、少なくともCaNAの切断阻害剤を含有する培養培地の添加剤を意味する。本発明の細胞培養培地の添加剤は、配列番号2のペプチドおよび細胞内導入シグ

ナルペプチドからなるCaNAの切断阻害剤を含有することが好ましく、配列番号1のペプチド、配列番号2のペプチドおよび細胞内導入シグナルペプチドからなるCaNAの切断阻害剤を含有することがさらに好ましい。

培養細胞に適用する場合、本発明のカルパインによるCaNAの切断阻害剤の添加量としては、細胞濃度 1×10^5 細胞/mlの培養液に0.01~100nmol/mlが好ましく、0.1~10nmol/mlがより好ましい。添加量が0.01nmol/mlより少ない場合、CaNAの切断阻害剤の効果が半減する傾向があり、100nmol/mlより多い場合には細胞毒性を示す傾向がある。

以下の実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら制限を受けるものではない。

実施例1

本発明のCaNAの切断阻害剤としてFDGATAAARKEVIRNK（配列番号1）およびREESVLTCLKGLTPTG（配列番号2）を培養細胞内に導入するため、以下に示すようにN末端に細胞内導入シグナルペプチド（10個のアルギニン）を付加したオリゴペプチドを製造した（ペプチド研究所社製）。

RRRRRRRRRRRRFDGATAAARKEVIRNK（配列番号5）

RRRRRRRRRRRRREESVLTCLKGLTPTG（配列番号6）

（神経細胞の調製）

ウイスターラット（Wister rat）胎児18日目の脳海馬を摘出後、0.05%トリプシンを含むPBSで15分間37℃で処理した。ガラスピペットを用いて神経細胞を分散させた後、あらかじめポリ-D-リジンでコーティングした直径3.5cm培養皿に、細胞を 1×10^6 個培養した。培地は、B27サプリメント（0.03ml；インビトロジェン社

(Invitrogen, Inc.) 製)、ペニシリン (最終濃度 100 単位/ml; インビトロジェン社製) およびストレプトマイシン (最終濃度 100 μ g/ml; インビトロジェン社製) を添加した 3ml Neuro Basal 1 培地 (インビトロジェン社製) を使用し、炭酸ガスインキュベーター (5% CO₂、37℃) 中で行った。

(ペプチドの添加)

培養開始 10 日後に、培養液中に最終濃度 1 μ M で前記配列番号 5 および 6 のペプチドを添加し、炭酸ガスインキュベーター (5% CO₂、37℃) においてインキュベーションした。添加後 3 時間してから、最終濃度 500 μ M のグルタミン酸を添加し、15 分間インキュベーションした。ついで、培養液を交換し、さらに培養した。グルタミン酸添加後 3 時間および 24 時間後、細胞を回収し、1% SDS 溶液で細胞を超音波粉碎し、SDS-PAGE バッファーを加えた。同サンプルを SDS-PAGE ゲル電気泳動法に供した後、CaNA を認識する抗体 (ラビット血清、サンタクルーズバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 製) でウエスタンブロッティングを行った。なお、本実施例においては、グルタミン酸および切断阻害ペプチドを添加しない細胞試料をコントロールとして用いた。また、並行して、グルタミン酸のみを添加した細胞試料および切断阻害ペプチドのみを添加した細胞試料も作製した。

結果を図 1 に示す。グルタミン酸添加群では、カルシニューリンの断片化が認められた。一方、切断阻害ペプチドを導入した神経細胞では、グルタミン酸添加により通常起こり得るカルシニューリンの切断が阻害された。

実施例 2

実施例 1 と同様に神経細胞を培養し、ついで実施例 1 と同様に神経細胞に最終濃度 1 μ M になるように前述の配列番号 5 および 6 のペプチドを添加した。コントロールとして、カルシニューリン阻害剤の FK506 (フ

ジサワ製薬株式会社；最終濃度 $1 \mu\text{M}$) またはカルパイン阻害剤の ALLM (メルク社；最終濃度 $25 \mu\text{M}$) 加えた。それぞれの薬剤を 2 時間インキュベーションした後、最終濃度 $500 \mu\text{M}$ のグルタミン酸を添加し、15 分間インキュベーションした。ついで、培養液を交換し、さらに培養した。添加後 3 時間、6 時間、12 時間または 24 時間後、それぞれの神経細胞は 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。その後、細胞死を起こした神経細胞を同定するために、TUNEL 染色 (ロッシュ・ダイアグノスティクス社 (Roche Diagnostics, Inc) 製) を行った。TUNEL 陽性細胞をカウントした。

結果を図 2 に示す。グルタミン酸投与群では、投与後時間経過と共に細胞死を起こしている神経細胞の数が上昇した。切断阻害ペプチドはグルタミン酸で誘導される神経細胞死を抑制する効果があることが判明した。また、その効果は、FK506、ALLM と同程度の効果であった。

参考例 1

牛脳より精製したカルシニューリン $1 \mu\text{M}$ を $1 \mu\text{M}$ カルモジュリン (メルク社 (Merck, Inc) 製) および/または $1 \mu\text{M}$ m-カルパイン (メルク社製) と反応液中 (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 を含む) で 30°C 、1 時間それぞれ反応させ、その後 12% SDS-PAGE ゲル電気泳動法を行なった後、クマシーブルーにて同ゲルを染色した。

その結果、カルパインを添加していない場合、精製 CaNA は、電気泳動上 60Kda の大きさにみられた。これは、これまで報告されている CaNA の大きさに一致するものである。一方、カルモジュリンとカルパインとを添加した場合、 60Kda にバンドは認められず、 48 および 45Kda にバンドが認められた。カルパインのみと反応させると、 45Kda の大きさに切断された CaNA が認められた。

前記結果より、カルシニューリンがカルパインにより切断されることは明らかである。

さらに、カルパインによるC a N Aの切断部位を決定したところ、45 K d a切断蛋白は、アミノ酸配列392番までのアミノ酸で構成され、48 K d aの切断蛋白は、421番まで、422番まで、423番まで、および424番までのアミノ酸で構成されていた。

産業上の利用可能性

本発明はC a N Aの切断阻害剤を提供した。本発明のC a N Aの切断阻害剤は、カルシニューリンの不可逆的な活性化を阻害することができるため、該活性化により誘発される神経細胞死を抑制することができる。また、C a N Aの切断阻害剤を含有する本発明の神経細胞死抑制剤は、痴呆性疾患など神経細胞死に関連する疾患の予防ないし治療薬として使用することができるため、極めて有用である。さらに、C a N Aの切断阻害剤を含有する本発明の培養細胞培地の添加剤を用いれば、培養細胞の生育をよくすることもできる。また、本発明のC a N Aの切断阻害剤は、神経細胞死に関する研究用試薬としても使用することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号5：ヒト由来のペプチド配列と人工的なペプチド配列とからなるペプチド配列

配列番号6：ヒト由来のペプチド配列と人工的なペプチド配列とからなるペプチド配列

請求の範囲

1. 配列番号1のペプチド、配列番号2のペプチドおよび／またはそれらの類似体を含む、カルパインによるカルシニューリンAサブユニットの切断阻害剤。
2. 請求の範囲第1項記載のカルシニューリンAサブユニットの切断阻害剤を有効成分とする神経細胞死抑制剤。
3. 請求の範囲第1項記載のカルシニューリンAサブユニットの切断阻害剤を有効成分とする痴呆性疾患の進行抑制剤。
4. 請求の範囲第1項記載のカルシニューリンAサブユニットの切断阻害剤を含む細胞および脳スライス培養培地の添加剤。

FIG. 1 (a)

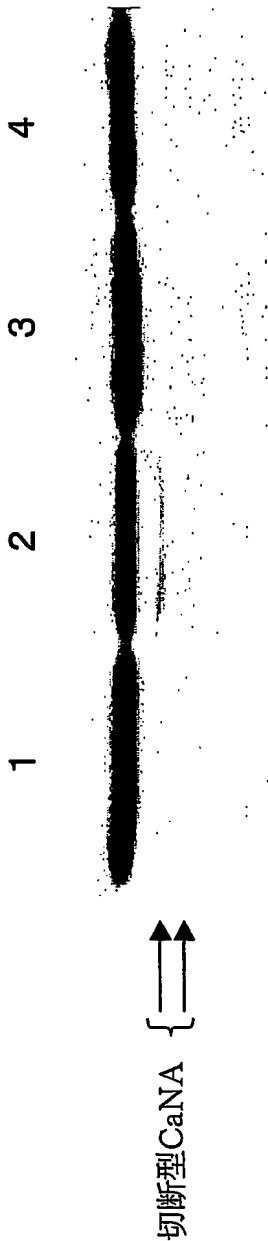
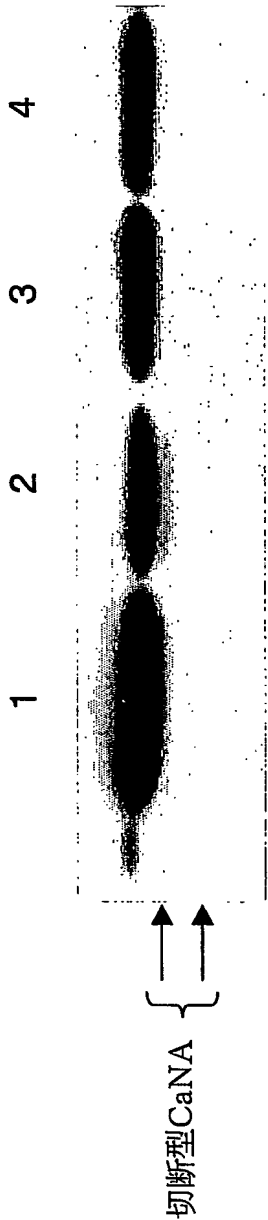
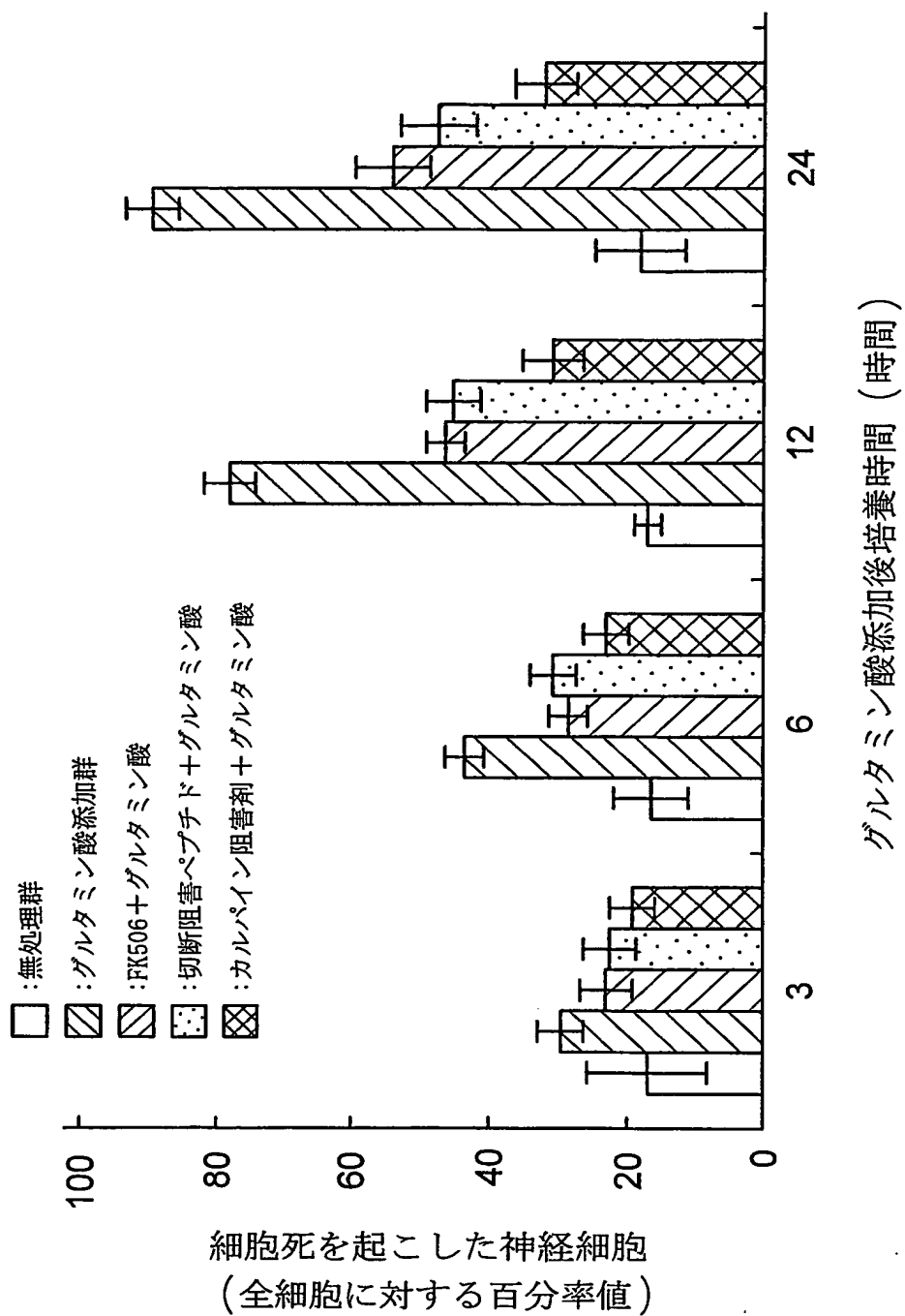


FIG. 1 (b)



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 2



SEQUENCE LISTING

<110> Tomizawa, Kazuhito

Matsui, Hideki

<120> Inhibitor of constitutive active forming of carcineurin

<130> JP-13650

<160> 6

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Phe Asp Gly Ala Thr Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys

1

5

10

15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Arg Glu Glu Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 521

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg

1 5 10 15

Val Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Ser His Arg Leu Thr Ala Lys

20 25 30

Glu Val Phe Asp Asn Asp Gly Lys Pro Arg Val Asp Ile Leu Lys Ala

35 40 45

His Leu Met Lys Glu Gly Arg Leu Glu Glu Ser Val Ala Leu Arg Ile

50 55 60

Ile Thr Glu Gly Ala Ser Ile Leu Arg Gln Glu Lys Asn Leu Leu Asp

65 70 75 80

Ile Asp Ala Pro Val Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe

85 90 95

Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg

100	105	110
Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu		
115	120	125
Cys Val Leu Tyr Leu Trp Ala Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Leu		
130	135	140
Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe		
145	150	155
160		
Thr Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Asp		
165	170	175
Ala Cys Met Asp Ala Phe Asp Cys Leu Pro Leu Ala Ala Leu Met Asn		
180	185	190
Gln Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile Asn Thr		
195	200	205
Leu Asp Asp Ile Arg Lys Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Tyr		
210	215	220
Gly Pro Met Cys Asp Ile Leu Trp Ser Asp Pro Leu Glu Asp Phe Gly		
225	230	235
240		
Asn Glu Lys Thr Gln Glu His Phe Thr His Asn Thr Val Arg Gly Cys		
245	250	255

Ser Tyr Phe Tyr Ser Tyr Pro Ala Val Cys Asp Phe Leu Gln His Asn

260

265

270

Asn Leu Leu Ser Ile Leu Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr

275

280

285

Arg Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr

290

295

300

Ile Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala

305

310

315

320

Val Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys

325

330

335

Ser Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp

340

345

350

Ser Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val

355

360

365

Leu Asn Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe

370

375

380

Asp Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile

385

390

395

400

Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu

405

410

415

Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu

420

425

430

Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser Ala Thr

435

440

445

Val Glu Ala Ile Glu Ala Asp Glu Ala Ile Lys Gly Phe Ser Pro Gln

450

455

460

His Lys Ile Thr Ser Phe Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile Asn

465

470

475

480

Glu Arg Met Pro Pro Arg Arg Asp Ala Met Pro Ser Asp Ala Asn Leu

485

490

495

Asn Ser Ile Asn Lys Ala Leu Ala Ser Glu Thr Asn Gly Thr Asp Ser

500

505

510

Asn Gly Ser Asn Ser Ser Asn Ile Gln

515

520

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

6/7

<213> HIV virus

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Asp Gly Ala Thr Ala

1

5

10

15

Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys

20

25

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> human

<400> 6

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Glu Glu Ser Glu Ser

1

5

10

15

Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06,
1/38//C07K14/81, C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06,
1/38//C07K14/81, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TALLANT, E.A. et al., Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca ²⁺ -dependent protease., Biochemistry, 1988, Vol.27, No.6, pp.2205-11	1-4
A	WO 02/00872 A2 (EXON-HIT THERAPEUTIC SA.), 03 January, 2002 (03.01.02), & WO 02/00872 A3 & FR 2810995 A1	1-4
A	Hideki MATSUI et al., "Saibo no Kino Seigyo to Calcium Seminar Calcineurin no Kozo to Kino", Clinical Calcium, 1993, Vol.3, No.11, pp.58(1490)-63(1495)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 January, 2004 (06.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12816

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, M.J. et al., Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death., Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 2002 July, Vol.99, No.15, pp.9870-5	1-4
A	SPRINGER, J.E. et al., Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury, J.Neurosci., 2000, Vol.20, No.19, pp.7246-51	1-4
A	ASAI, A. et al., High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis, J.Biol. Chem., 1999, Vol.274, No.48, pages 34450 to 34458	1-4
A	MORIOKA, M. et al., Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury, Prog. Neurobiol., 1999, Vol.58, No.1, pages 1 to 30	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06, 1/38 // C07K14/81, C12N9/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06, 1/38 // C07K14/81, C12N9/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TALLANT, E. A. et al, Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca ²⁺ -dependent protease. Biochemistry, 1988, Vol.27, No.6, pp.2205-11	1-4
A	WO 02/00872 A2(EXON-HIT THERAPEUTIC SA)2002.01.03 & WO 02/00872 A3 & FR 2810995 A1	1-4
A	松井 秀樹 等、細胞の機能制御とカルシウム・Seminar カルシニューリンの構造と機能、Clinical Calcium, 1993, Vol.3, No.11, pp.58(1490)-63(1495)	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.01.2004

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝田 浩一 印

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KIM, M. J. et al, Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002 Jul, Vol.99, No.15, pp.9870-5	1 - 4
A	SPRINGER, J. E. et al, Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury, J. Neurosci., 2000, Vol.20, No.19, pp.7246-51	1 - 4
A	ASAI, A. et al, High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis, J. Biol. Chem., 1999, Vol.274, No.48, pp.34450-34458.	1 - 4
A	MORIOKA, M. et al, Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury, Prog. Neurobiol., 1999, Vol.58, No.1, pp.1-30.	1 - 4

**EXACT ENGLISH LANGUAGE
TRANSLATION OF THE PCT
APPLICATION AS
ORIGINALLY FILED
WITH SEQUENCE LISTING
AND ABSTRACT**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06,
1/38//C07K14/81, C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/55, 38/46, A61P25/00, 25/28, 43/00, C12N5/06,
1/38//C07K14/81, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TALLANT, E.A. et al., Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca ²⁺ -dependent protease., Biochemistry, 1988, Vol.27, No.6, pp.2205-11	1-4
A	WO 02/00872 A2 (EXON-HIT THERAPEUTIC SA.), 03 January, 2002 (03.01.02), & WO 02/00872 A3 & FR 2810995 A1	1-4
A	Hideki MATSUI et al., "Saibo no Kino Seigyo to Calcium Seminar Calcineurin no Kozo to Kino", Clinical Calcium, 1993, Vol.3, No.11, pp.58 (1490)-63 (1495)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12816

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
AD A	KIM, M.J. et al., Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death., Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 2002 July, Vol.99, No.15, pp.9870-5	1-4
AF A	SPRINGER, J.E. et al., Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury, J.Neurosci., 2000, Vol.20, No.19, pp.7246-51	1-4
AB A	ASAI, A. et al., High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis, J.Biol. Chem., 1999, Vol.274, No.48, pages 34450 to 34458	1-4
AE A	MORIOKA, M. et al., Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury, Prog. Neurobiol., 1999, Vol.58, No.1, pages 1 to 30	1-4